

Synthèse des travaux de recherche

Etude des voies de signalisation TLR/MyD88 en situation normale et immunopathologique.

1. Résumé

Les Récepteurs Toll-Like (TLR) permettent d'initier et d'orienter les réponses immunes dirigées contre les pathogènes. Ils participent également à la régulation des réponses induites, comme en témoigne leur implication dans de nombreuses maladies du système immunitaire.

Notre recherche a eu pour objectif d'étudier le rôle des voies de signalisation TLR en situation normale et immunopathologique. Nous avons démontré que : 1) les agonistes des TLR protègent efficacement de l'apparition du diabète spontané chez la souris NOD *via* l'activation et/ou le recrutement de cellules régulatrices et la production de cytokines immunorégulatrices; 2) Les cellules iNKT sont activées par l'agoniste TLR7 ; 3) La signalisation *via* TLR7 protège de l'asthme allergique. 4) la voie signalisation *via* TLR2/MyD88 a un effet majeur sur le développement de l'athérosclérose, ainsi que sur la production de chimiokines et cytokines ; 5) la voie de signalisation MyD88 est impliquée dans le développement et la fonction des lymphocytes iNKT. En conclusion, notre travail met en évidence les propriétés immunomodulatrices des voies de signalisation TLR.

2. Les récepteurs Toll-like (TLR) dans l'immunité

Chez les mammifères, système inné et adaptatif coopèrent, le premier détectant la présence de microorganismes invasifs et induisant les réponses inflammatoires nécessaires au recrutement et à l'activation des cellules du système adaptatif. Alors même que les mécanismes

réglissant les réponses adaptatives étaient de mieux en mieux connus, la question de la reconnaissance initiale des pathogènes est longtemps restée en suspens. Charles Janeway avait proposé dès 1989 que des récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires associés aux pathogènes permettaient d'initier les réponses innées anti-infectieuses. Quelques années plus tard, Polly Matzinger a contribué à l'évolution de ces théories en apportant la notion du danger. La découverte des récepteurs Toll-like (TLR) par l'équipe Jules Hoffman, a permis en 1996 de donner un nom à ces récepteurs de l'immunité innée. Très rapidement, leur rôle a été élargi aux réponses adaptatives, ouvrant de nouvelles perspectives quant à l'incidence de l'environnement sur le développement et la régulation des réponses immunes (Akira et al., 2006). Depuis, la signalisation des TLR se révèle chaque jour un peu plus sophistiquée (Fig.1) (Yamamoto et al., 2003; O'Neill and Bowie, 2007).

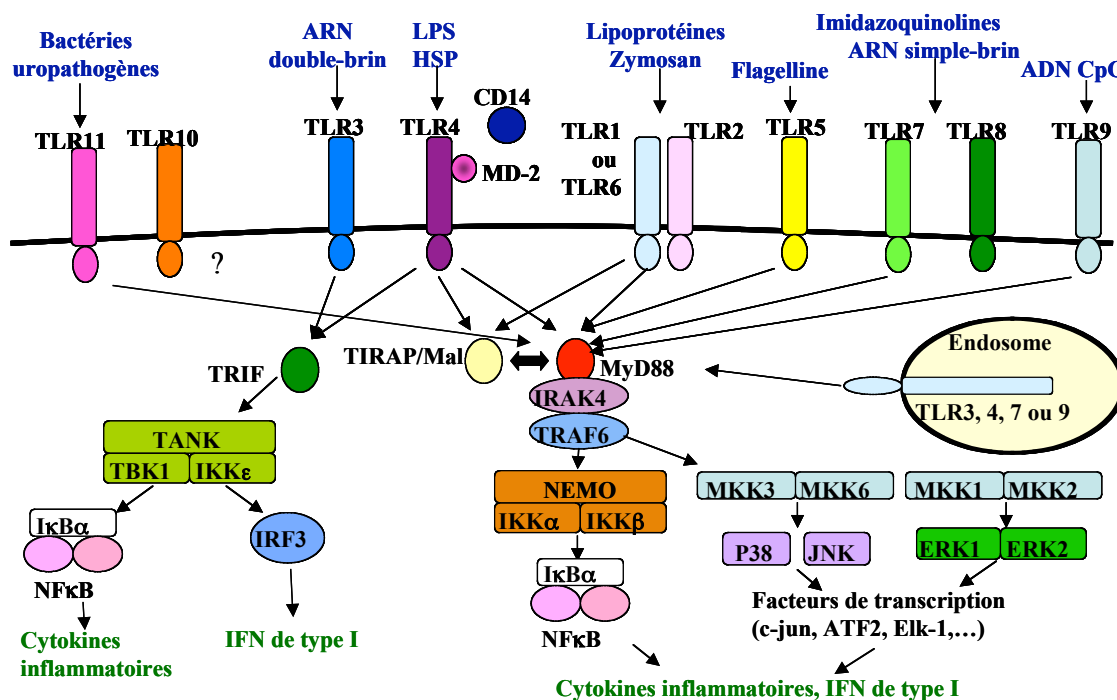


Figure 1. Voies de signalisation simplifiées des TLR

Les TLR, de par leur capacité à détecter la présence de motifs moléculaires invariants spécifiques des pathogènes (PAMP), jouent un rôle essentiel dans la mise en place de la réponse immunitaire chez les vertébrés (Akira et al., 2006). Conservés tout au long de l'évolution, les

TLR sont exprimés par un grand nombre de types cellulaires, conférant ainsi aux cellules, y compris non immunitaires, la capacité de distinguer le soi du non-soi.

Les TLR sont donc les premiers senseurs des infections tant bactériennes que fongiques, parasitaires ou virales et peuvent orienter la réponse immune vers un phénotype tant T helper (Th) 1 que Th2, Th17 ou T régulateur (Treg). Leur aptitude à activer les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), notamment les cellules dendritiques (DC), place ces récepteurs à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Initialement décrits pour leur capacité à induire une réponse inflammatoire anti-infectieuse, les TLR sont aujourd'hui connus pour intervenir dans de nombreuses maladies allergiques et auto-immunes ouvrant de nouvelles perspectives dans le champ thérapeutique.

Principaux objectifs

Mes travaux de recherche portent essentiellement sur la modulation des réponses immunes en situation immunopathologique. Historiquement, mon objectif était l'étude des mécanismes de reconnaissance de l'immunité innée aux glycolipides bactériens. Avec l'identification des TLR, j'ai poursuivi mes travaux en étudiant les mécanismes de reconnaissance de molécules extraites d'agents microbiens par les TLR dans un contexte infectieux. Depuis les cinq dernières années, un aspect fondamental de mon projet de recherche a été de tester « l'hypothèse dite de l'hygiène », en postulant que non seulement les infections mais aussi des molécules de pathogènes activant les TLR pourraient être des cibles critiques impliquées dans la modulation des pathologies autoimmunes et allergiques par des mécanismes encore inconnus. Dans ce contexte, j'ai utilisé le modèle autoimmun de la souris Non Obese Diabetic (NOD) et un modèle d'asthme expérimental allergique. Enfin, la voie de signalisation TLR / MyD88 peut être également activée par des ligands endogènes. L'étude d'un modèle inflammatoire non infectieux, l'athérosclérose de la souris déficiente en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}), s'inscrit dans ce cadre.

3. TLR et infections

La reconnaissance des produits microbiens constitue la principale forteresse de nos défenses contre une infection. Chez les vertébrés, les mécanismes innés à la fois éduquent la réponse immunitaire adaptative et fournissent une protection immédiate contre les défis infectieux. Un de mes objectifs était d'étudier la capacité de certaines structures de pathogènes à activer une voie TLR-dépendante, à analyser l'incidence physiologique de cette observation et à étudier si cette réponse pouvait favoriser la maturation des cellules dendritiques ainsi que l'induction d'une réponse protectrice. Ces aspects ont fait l'objet de nombreuses études expérimentales dans lesquelles je me suis largement investie pendant plusieurs années et ont conduit à plus d'une dizaine de publications internationales. Les résultats qui ont un impact critique dans le développement de mon programme de recherche seront ici mentionnés dans ce dossier.

a. Reconnaissance innée d'une protéine bactérienne de *Klebsiella pneumoniae* via TLR2

La protéine A de la membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA) active les macrophages et les DC via la voie de signalisation (Jeannin et al., 2002). TLR2. Cependant, TLR2 n'est pas impliqué dans la liaison de KpOmpA aux cellules immunitaires. KpOmpA se lie aux récepteurs scavenger LOX-1 et SREC-1, mais pas aux autres membres de cette famille. LOX-1 colocalise et coopère avec TLR2 pour stimuler les réponses cellulaires. Le programme fonctionnel de la stimulation via TLR2 inclut la production de la pentraxine PTX3, récepteur soluble impliqué dans la résistance contre divers pathogènes. PTX3 se lie à KpOmpA mais ne modifie pas la reconnaissance de cette structure par les récepteurs cellulaires. KpOmpA induit *in vivo* une inflammation qui est bloquée dans les souris TLR2^{-/-} et significativement diminuée dans les souris PTX3^{-/-}. Par conséquent, la reconnaissance immunitaire innée de KpOmpA implique des récepteurs cellulaires tels que les récepteurs scavenger et la voie de signalisation dépendante de TLR2 et une boucle amplificatrice humorale via PTX3 .

Publication : Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors.

Jeannin P., Bottazzi B., Sironi M., Rustani M., Maina V., Magistrelli G., Haeuw J.F. Hoeffel G., Thieblemont N., Corvaia N., Garlanda C., Delneste Y., Mantovani A. Immunity 2005, 22:551-60.

Bien que les cellules natural killer (NK) $CD56^+CD3^-$ participent aux réponses immunitaires contre les microorganismes, leur capacité à reconnaître directement et à être activées par les pathogènes est peu connue. Ces cellules expriment les gènes codant pour les TLR impliqués dans l'activation des cellules de l'immunité innée après reconnaissance par des PAMPs. Nous avons donc évalué la capacité de 2 protéines bactériennes PAMPs, KpOmpA et la flagelline, lesquelles signalent respectivement via TLR2 et TLR5, à stimuler directement les cellules NK humaines. Ces protéines induisent la production d'IFN- γ et synergisent dans l'activation de cytokines proinflammatoires avec l'IL-2 après stimulation par les PAMPs. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des cellules T NK $CD56^+CD3^+$. Les cellules NK des souris TLR2 $^{-/-}$ ne répondent pas à une stimulation par KpOmpA, démontrant l'implication des TLR dans cette réponse. Les défensines sont des peptides antimicrobiens exprimés principalement par les cellules épithéliales et les neutrophiles qui détruisent la membrane bactérienne conduisant à la mort du pathogène. Nous avons montré que les cellules NK et T NK expriment constitutivement des défensines- α et que la stimulation par KpOmpA ou la flagelline induisent rapidement leur libération. Ces résultats démontrent pour la première fois que les cellules NK purifiées reconnaissent directement et répondent aux composants bactériens via les TLR et que les défensines participent dans la réponse protectrice des cellules NK contre les microorganismes.

Publication : Direct recognition of bacterial protein PAMPs by human NK and NKT cells.

Chalifour C., Delneste Y., Gauchat J.F., Herbault-Bruguiere N., Malissard M., Thieblemont N., Jeannin P. Blood. 2004, 104:1778-1783.

b. Réponse innée des cellules iNKT aux infections virales

Les cellules iNKT (pour « invariant Natural Killer T »), constituent un lignage particulier de cellules T avec des propriétés régulatrices dans les infections, l'asthme allergique, le diabète

autoimmunitaire et le cancer. Ces cellules peuvent être activées sous l'impulsion d'un ligand glycolipidique synthétique, l' α -galactosylcéramide (α -GalCer), lequel reconnaît sélectivement leur TCR (Bendelac et al., 1995). Les propriétés régulatrices de cette population T, qui exprime une chaîne TCR α invariante V α 14J α 18 et qui est sélectionnée par la molécule CD1d, reposent à la fois sur son auto-réactivité (un glycolipide endogène sélectionnant ces cellules a été identifié et sur sa dualité fonctionnelle (production rapide et massive de cytokines Th1, Th2 et Th3, pouvoir cytotoxique) (Van Kaer, 2004; Mendiratta et al., 1997).

Il a été montré que les cellules NKT sont activées lors d'infections. Par exemple, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (ou VIH) et le virus de l'hépatite B (HBV) active les cellules iNKT. Cependant, la liste des ligands capables de stimuler les cellules iNKT via leur TCR ne permet pas d'expliquer comment les cellules iNKT sont activées par ces virus. Nous avons comparé la capacité des agonistes TLR d'activer ces cellules. Alors que la plupart des agonistes TLR ne stimulent pas les cellules iNKT en l'absence d'APC, nous avons observé que l'agoniste TLR7, le R848 ou résiquimod (Fig. 2), un composé synthétique de la famille des imidazoquinolines (Kawai and Akira, 2007) active les cellules iNKT : L'injection de R8484 aux souris augmente de l'expression des marqueurs d'activation et induit une production de cytokines sériques dépendante de la présence des cellules iNKT. De nombreux virus, y compris le VIH, HBV, HCV, influenza, HSV expriment des PAMP qui stimulent la voie de signalisation TLR7 (Fig. 2). *In vitro*, nous avons observé une production d'IFN- γ par les cellules iNKT en réponse à l'agoniste R848, en présence d'IL-12. L'injection de R848 aux souris induit une augmentation de la production d'IL-4 et d'IFN- γ sériques induite dans les souris sauvages dépendante des cellules iNKT puisque cette réponse est absente dans les souris dépourvues de cellules iNKT. Il est à noter que cette réponse ne nécessite pas d'APC et est indépendante de CD1d. En conclusion, ces travaux montrent que les cellules iNKT se comportent comme des cellules innées dans un environnement « pro-inflammatoire » approprié.

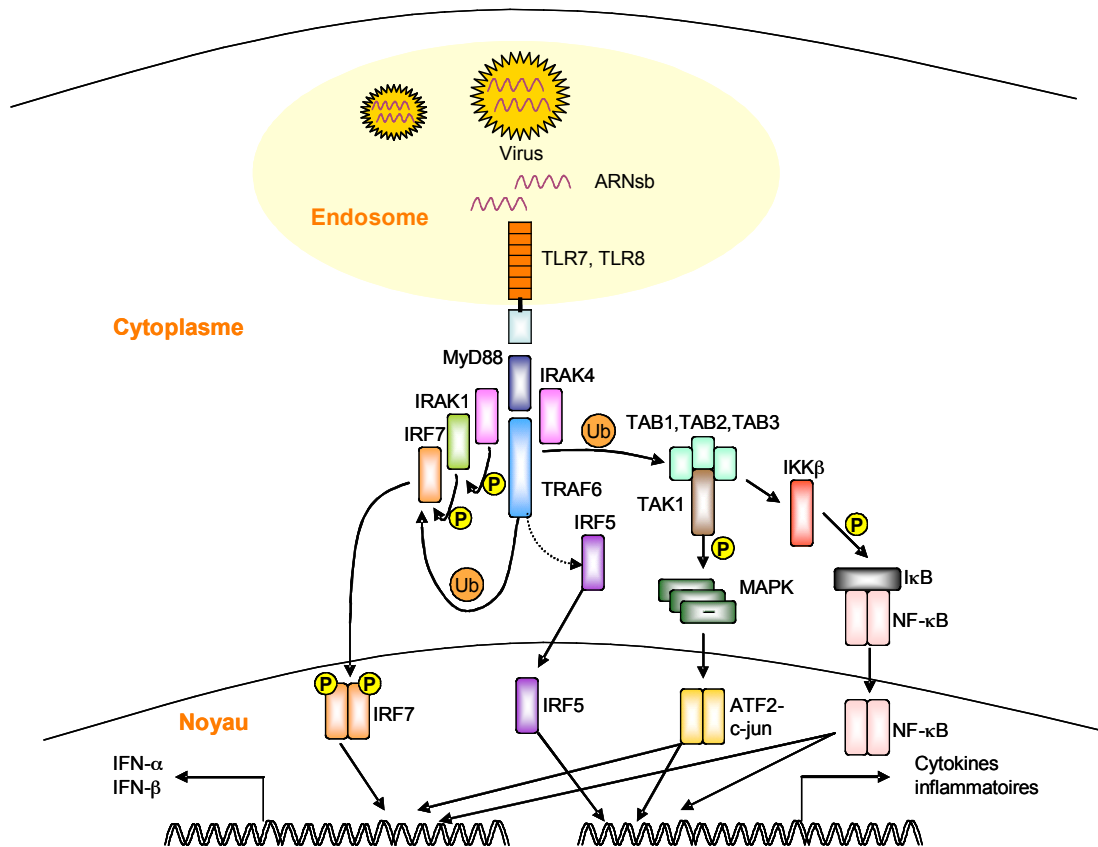


Figure 2. Reconnaissance des acides nucléiques viraux par TLR7, TLR8. La détection des ARNsb par TLR7 conduit au recrutement de l'adaptateur MyD88, qui interagit avec IRAK4 et TRAF6. En retour, ce dernier active TAK1 par un mécanisme dépendant de l'ubiquitinylation. TAK1, en association avec TAB1, 2 et 3 active NF-κB et ATF2-c-jun par la dégradation d'IκB par IKK et l'activation des MAPK respectivement. Cette voie contrôle l'expression de cytokines inflammatoires. MyD88 s'associe également avec IRAK1 et IRF7. Ce dernier est phosphorylé par IRAK1 et passe dans le noyau. L'ubiquitinylation par TRAF6 est aussi nécessaire à l'activation d'IRF7. Cette voie régule l'expression des IFN de type I. D'après Kawai *et al.* (Kawai and Akira, 2007).

Publication : Invariant Natural Killer T cells behave as innate cells responding directly to Toll-like receptor 7 stimulation : implications in allergic asthma

Grela F, Bardel, E., Aumeunier A, Dy M., Herbelin A., Thieblemont N. Manuscrit soumis

4. TLR et allergie

De nombreuses études épidémiologiques ont souligné l'existence d'une relation inverse entre les conditions sanitaires (hygiène, vaccination, traitements antibiotiques, contact avec les animaux, qualité de l'eau et de l'alimentation) et le taux de maladies allergiques et auto-immunes. De plus, certaines bactéries ont un effet protecteur contre les maladies inflammatoires dont la colite. A l'inverse, certaines infections peuvent induire et/ou accélérer le développement de ces mêmes maladies. Bien que contradictoires, ces données suggèrent que les microorganismes jouent un rôle critique dans le développement de nombreuses maladies du système immunitaire. L'évolution des maladies en question dépend à la fois de facteurs environnementaux et génétiques. Si la génétique permet de démontrer les liaisons spécifiques de gènes associés à chaque pathologie, il est conceptuellement peu probable qu'elle soit responsable de l'émergence très rapide des maladies allergiques et autoimmunes dans les pays les plus industrialisés (Fig. 3). Aussi, il a été postulé que les facteurs environnements pourraient être fortement impliqués dans cette récente évolution (Strachan, 1989; Bach, 2002). D'un point de vue expérimental, les facteurs environnementaux sont nombreux et parfois difficilement contrôlables : microorganismes (pathogènes ou non) présents dans l'atmosphère, infections, microflore commensale, régime alimentaire, niveau de stress, etc. Ces différents facteurs influent sur les réponses physiologiques et ce, très fréquemment, *via* l'activation des récepteurs Toll-like.

En faveur de cette hypothèse, de récentes études cliniques ont en effet mis en évidence une association positive entre la prédisposition à l'asthme ou l'atopie ou leur sévérité et l'existence de mutations dans les gènes *tlr2*, *tlr4*, *tlr6*, *tlr9* et *tlr10*.

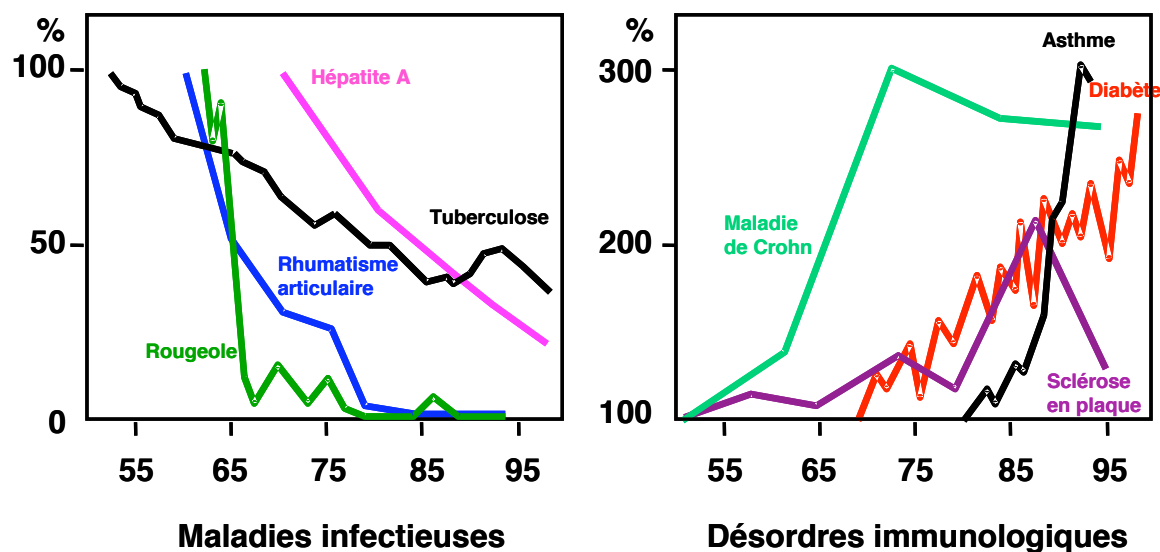


Figure 3. Evolution de l'incidence des infections et des maladies autoimmunes et allergiques dans les pays industrialisés durant les quatre dernières décennies .

D'après Bach J.F. (Bach, 2002).

La stimulation de la voie de signalisation TLR7 protège de l'asthme allergique

Les TLR étant impliqués dans l'orientation de points décisifs de la régulation immunitaire, l'étude a été focalisée sur l'utilisation d'un réactif agissant sur TLR7 présentant des activités immuno-régulatrices et pour lesquels nous avons préalablement démontré un potentiel thérapeutique dans l'asthme allergique.

Des avancées majeures dans notre compréhension de la physiopathologie de l'asthme ont été réalisées grâce aux modèles expérimentaux murins d'asthme allergique (Umetsu et al., 2002). Ces travaux ont d'abord démontré que l'asthme allergique est une maladie inflammatoire pulmonaire déclenchée par une réponse immunitaire de type Th2 disproportionnée. Ainsi, il a été démontré que la sécrétion de cytokines de type Th2, c'est-à-dire les cytokines IL-4, IL-6, IL-10 et IL-13 privilégiant l'immunité humorale, génère une inflammation riche en éosinophiles, avec une prolifération cellulaire et une augmentation de la production de mucus. Cette réponse de type Th2 est aussi responsable de l'hyperactivité broncho-pulmonaire (HRB) ainsi que de la production d'IgE qui mène à l'activation locale des mastocytes.

Au cours des dernières années, les modèles animaux ont permis de révéler que l'asthme allergique est sous le contrôle de populations T dites régulatrices. Les cellules T $CD4^+CD25^+$ (ou T_{reg}), ainsi que des cellules T suppressives exprimant un phénotype proche des cellules Tr1 et des cellules Th3 sont capables d'inhiber les réponses effectrices de type Th2 impliquées dans l'asthme allergique.

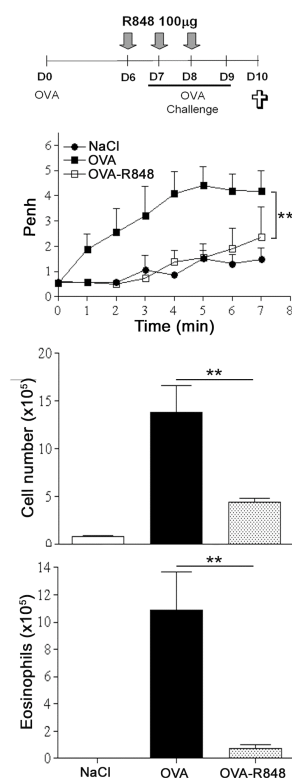


Figure 4. Le traitement par R848 protège les souris contre le développement de l'asthme expérimental allergique. Hyperactivité bronchique (mesurée à l'aide d'un pléthysmographe), nombre de cellules et pourcentage d'éosinophiles dans les poumons (après coloration des cellules obtenues dans le lavage bronchopulmonaire) et production des cytokines IL-4, IL-5 et de la chimiokine éotaxine (quantifiées par ELISA).

Nous avons testé la capacité de l'agoniste TLR7, R848 à inhiber l'asthme expérimental allergique. Nous avons observé une protection contre l'asthme allergique expérimental après un traitement par l'agoniste TLR7. En effet, nous avons observé que le traitement par R848 inhibait l'hyperactivité

bronchique et les critères immunologiques tels que le recrutement des éosinophiles dans les poumons ainsi que la production de cytokines IL-4, IL-5 et de la chimiokine l'éotaxine (Fig. 4). Nous avons proposé que cette protection puisse être induite par la production d'IFN- γ par les cellules iNKT en réponse à cet agoniste. Par transfert adoptif, nous avons validé cette hypothèse en utilisant des cellules iNKT triées provenant de souris invalidées pour cette cytokine.

Publication : Invariant Natural Killer T cells behave as innate cells responding directly to Toll-like receptor 7 stimulation: implications in allergic asthma.

Grela F, Bardel, E., Aumeunier A, Dy M., Herbelin A., Thieblemont N. Manuscrit soumis.

5. TLR et autoimmunité

Dans les pays occidentaux, l'incidence du DT1 est en constante augmentation. Parallèlement, les maladies infectieuses régressent, laissant supposer un lien de causalité entre ces deux événements. Dans le modèle de la souris NOD, des observations similaires ont été réalisées, les animaux pouvant être protégés de l'apparition spontanée de la maladie par l'inoculation de bactéries, virus ou parasites.

La souris NOD constitue le modèle murin le plus utilisé pour l'étude du DT1 qu'elle développe spontanément et de façon très similaire à la maladie humaine (Bach and Chatenoud, 2001). Dès l'âge de 3-4 semaines, la souris NOD développe une péri-insulite caractérisée par l'accumulation de cellules mononucléées autour des îlots de Langerhans. S'ensuivent alors l'infiltration des îlots pancréatiques (insulite) et la destruction des cellules β productrices d'insuline, prélude au diabète clinique observable vers 12-14 semaines de vie. Entre 25 et 30 semaines d'âge, l'ensemble des souris est atteint de péri-insulite et l'incidence du diabète varie de 70 à 90% chez les femelles contre 20 à 30% chez les mâles.

A l'instar de la maladie humaine, le DT1 chez la souris NOD est donc sous le double contrôle de facteurs environnementaux et génétiques dont le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Toutefois, si la molécule de classe II du CMH I-A^{g7} est indispensable à la survenue de la maladie, elle n'est pas suffisante au développement du diabète et une vingtaine de gènes de susceptibilité ont été identifiés.

Les effecteurs principaux du DT1 restent les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dont le rôle a été établi grâce notamment aux expériences de transfert. Il est généralement admis que le DT1 de la souris NOD met en jeu des effecteurs Th1 dont le développement peut être contrecarré par des cytokines Th2. En effet, l'insulite destructrice est caractérisée par un rapport $IFN-\gamma/IL-4$ élevé *in situ* et les cytokines produites dans l'environnement immédiat des îlots favorisant le recrutement des cellules T auto-réactives sont plutôt de type Th1. Enfin, l'administration aux souris NOD d'IL-12, cytokine pro-Th1, accélère le développement du DT1 alors qu'à l'inverse l'incidence de la maladie est diminuée après traitement par l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13. Ces données sont toutefois à pondérer au vu des résultats obtenus chez les souris NOD *il10^{-/-}* et NOD *il-4^{-/-}* dont le diabète n'est pas accéléré. Il n'en reste pas moins que les cytokines immunorégulatrices jouent un rôle central dans la protection contre le DT1, entre autres par leur contribution à l'expansion et à la différenciation des populations de cellules régulatrices et/ou par leur action de sensibilisation des cellules effectrices à la suppression.

Bien que l'infiltration des îlots par les cellules auto-réactives ait lieu précocement dans la vie de la souris NOD, l'apparition du diabète clinique n'apparaît que plusieurs semaines ou mois plus tard. Cette observation indique que, bien que défailants à long terme, des mécanismes immunorégulateurs existent bel et bien dans ce modèle murin (Bach and Chatenoud, 2001). Parmi ces derniers, les cellules Treg $CD4^+CD25^+$ ont été particulièrement étudiées et leur rôle protecteur est bien établi grâce notamment à des expériences de co-transfert. De plus, les souris NOD *cd28^{-/-}* déficientes en cette population présentent un diabète accéléré. En terme d'activité, il semblerait que ces cellules puissent se dispenser de la présence d'IL-10 et d'IL-4 mais pas de TGF- β pour exercer leurs activités suppressives. Ainsi, l'administration transitoire de TGF- β au sein même des îlots peut induire l'expansion des Treg et l'expression de Foxp3 qui corrèlent avec la capacité de ces cellules à supprimer le DT1. Il reste toutefois à déterminer si les Treg peuvent eux-mêmes produire ce facteur ou s'ils dépendent pour cela d'autres types cellulaires. De nombreuses questions restent donc encore en suspens concernant l'origine et les mécanismes d'activation des Treg. Celles de la spécificité antigénique de ces cellules et de son importance dans leur activité sont particulièrement intéressantes dans le champ thérapeutique. En effet, s'il semble clair que l'induction de l'activité des Treg dépende de l'engagement de leur TCR, leurs fonctions suppressives ne sont pas spécifiques d'un antigène. Ainsi hypothétiquement,

l'induction de cette population cellulaire, par quelque moyen que ce soit, pourrait constituer un puissant outil thérapeutique.

Une autre population d'intérêt dans la prévention du DT1 est constituée par les lymphocytes T NK. Bien que leur rôle naturel dans l'histoire de la maladie reste sujet à controverse, de nombreux travaux visant à restaurer le nombre de NKT chez la souris NOD ont suggéré une activité protectrice de ces cellules vis-à-vis du DT1 des NKT, la stimulation de ces cellules par l' α -GalCer s'est révélé particulièrement efficace dans la protection de la maladie (Sharif et al., 2001). Plusieurs mécanismes pourraient contribuer à ce rôle protecteur des NKT. Ainsi le contrôle de la maladie serait associé à un déséquilibre de la balance cytokinique vers le type Th2. En effet, les NKT issus de souris NOD ont un défaut de production d'IL-4 et l'IL-4 et/ou l'IL-10 jouent un rôle central dans la protection contre le DT1 conférée par le transfert de thymocytes $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$. De plus, les NOD transgéniques $\text{V}\alpha 14\text{-J}\alpha 18$, dont le nombre élevé de NKT est responsable de leur résistance au DT1 induit par le cyclophosphamide, développent la maladie lorsque des anticorps bloquants anti-IL-4 leur sont administrés. Indépendamment des cytokines, les NKT semblent pouvoir contrôler directement par contact cellulaire l'activité des cellules T effectrices en induisant leur anergie et/ou apoptose. Cet effet protecteur des NKT activés pourrait s'exercer directement au sein même des îlots, ces cellules étant présentes dans les infiltrats pancréatiques chez la souris NOD dans des proportions décroissantes au fur et à mesure de la progression de l'insulite. Comme nous l'avons vu précédemment, les NKT aussi bien que les Treg expriment les TLR et leur activité peut être modulée, directement ou non, par les agonistes de ces récepteurs. Il est donc envisageable que ces cellules puissent être activées par différents composants microbiens, qu'il y ait infection ou simple exposition, et ainsi interviennent dans les phénomènes de protection contre les pathologies auto-immunes décrites précédemment.

Etude du rôle protecteur d'un extrait bactérien

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer si une préparation non infectieuse d'extraits bactériens, l'OM-85, pouvait également prévenir l'apparition spontanée de la maladie. Dans ce but, nous avons administré par voie intra péritonéale, durant 10 semaines consécutives, l'OM-85 à des souris NOD âgées de 3, 6, 10 ou 15 semaines au moment de la première injection. Les animaux traités de façon précoce ont été durablement et efficacement protégés de l'apparition

du diabète. Par contre, l'OM-85 s'est avéré inefficace à enrayer l'évolution de la maladie chez les animaux traités à partir de 10 ou 15 semaines d'âge. Les mêmes résultats ont été obtenus avec un traitement par voie orale, les doses de principe actif d'OM-85 requises pour observer une protection contre le DT1 étant toutefois nettement supérieures.

De nombreux facteurs humoraux et cellulaires ont été décrits pour leur effet protecteur contre le DT1 chez la souris NOD, dont les cytokines de type Th2 et Th3 et les cellules NKT. Nous avons donc cherché à déterminer si ces différents facteurs étaient impliqués dans l'effet protecteur de l'OM-85. Des souris NOD ont ainsi reçu des anticorps bloquants anti-IL-10R ou anti-TGF- β après l'administration d'OM-85. Seule la neutralisation du TGF- β a levé la protection induite par l'OM-85. Cette préparation bactérienne a également été administrée à des souris NOD *Cd1d*^{-/-}, dépourvues de lymphocytes NKT, et NOD *Il-4*^{-/-}. La déficience en IL-4 n'a aucun effet sur la réponse au traitement. A l'inverse, bien que statistiquement non significatif, les animaux déficients en CD1d sont moins bien protégés que ceux de type sauvage, suggérant l'implication des lymphocytes NKT dans l'effet de l'OM-85. Globalement, nos résultats indiquent que l'effet protecteur de l'OM-85 contre le DT1 chez la souris NOD est un phénomène actif, ne requérant pas les cytokines de type Th2 mais nécessitant la présence de TGF- β et des lymphocytes NKT.

L'OM-85 étant composé d'un mélange de 8 souches bactériennes, nous avons recherché la présence d'agonistes des TLR dans cette préparation. Des DC, obtenues à partir de cultures primaires de moelle osseuse de souris C57BL/6 de type sauvage ou déficientes en MyD88, TLR2 ou TLR4 ont donc été stimulées par l'OM-85 et la production d'IL-12p40 a été quantifiée. Le défaut de production de cette cytokine par les DC tant *Myd88*^{-/-} que *Tlr4*^{-/-} ou *Tlr2*^{-/-} témoigne de la présence d'agonistes de ces deux récepteurs dans l'OM-85 et de l'implication de la voie de signalisation dépendante de MyD88 dans la réponse induite.

Enfin, nous avons tenté de déterminer si ces agonistes des TLR contenus dans la préparation bactérienne pouvaient intervenir dans la protection contre le DT1 observée chez les animaux traités par l'OM-85. Nous avons donc stimulé des splénocytes totaux de souris C57BL/6 de type sauvage ou déficientes en MyD88, TLR2 ou TLR4 avec l'OM-85. Nous avons observé que cette préparation induisait une forte production d'IL-10 de façon totalement dépendante de MyD88. De plus, l'OM-85 induit une très forte sécrétion de TGF- β par les splénocytes, de façon dépendante de MyD88, TLR2 et TLR4, suggérant que ces récepteurs pourraient être impliqués dans la protection contre le DT1 induite par l'OM-85.

Ce manuscrit confirme le potentiel protecteur de préparations d'extraits bactériens contre le développement du DT1 spontané chez la souris NOD. Bien que soulignant le rôle majeur du TGF- β dans l'effet de l'OM-85, notre étude ne permet pas de déterminer la nature des cellules productrices, ni celle des cellules cibles de cette cytokine. Elle suggère cependant que l'effet protecteur s'exerce par l'intermédiaire des cellules régulatrices, dont les lymphocytes NKT, *via* l'activation des voies de signalisation TLR.

Publication : Transforming growth factor- β and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes

Alyanakian MA, Grela F, Aumeunier A, Chiavaroli C, Gouarin C, Bardel E, Normier G, Chatenoud L, Thieblemont N, Bach JF. Diabetes 2006, 55 : 179-185

La stimulation des voies de signalisation TLR2, 3, 4 et 7 protège les souris NOD du diabète autoimmun

Dans l'article précédent, nous avons démontré qu'un extrait bactérien, contenant des agonistes des TLR, prévenait l'apparition du DT1 spontané chez la souris NOD. Nous avons donc cherché à déterminer si des agonistes purifiés des TLR possédaient les mêmes propriétés.

Nous avons évalué l'effet de différentes molécules activant les voies de signalisation TLR sur l'évolution du DT1 spontané chez la souris NOD. Ces animaux ont donc reçu, tout au long de leur vie, des agonistes des TLR2 (le lipopeptideprotéine Pam₃Cys), TLR3 (le Poly(I:C)), TLR4 (le LPS) et TLR7 (le R848). Les molécules testées se sont révélées très efficaces à prévenir la maladie, la quasi-totalité des animaux présentant des glycosuries normales à 25 semaines d'âge contre 10 à 20% seulement chez les animaux contrôles non traités (Fig. 5).

Une réduction significative de l'insulite et du nombre d'îlots atrophiés a également été observée chez les souris traitées. Du point de vue histologique, les agonistes TLR ont induit une protection plus robuste, les animaux ayant reçu ce traitement présentant un pourcentage supérieur d'îlots parfaitement sains par rapport aux souris contrôles.

Des expériences de stimulation *in vitro* de splénocytes totaux ont démontré que ces agonistes TLR stimulent la production d'IL-10 et de TGF- β de façon dépendante de MyD88. *In vivo*, l'injection d'agoniste TLR induit chez les souris NOD une augmentation significative des concentrations sériques de ces deux cytokines et du taux de lymphocytes Treg dans le sang.

Globalement, ces résultats indiquent que les agonistes TLR peuvent moduler différents facteurs immunorégulateurs impliqués dans le contrôle du DT1. De la même façon que nous avons testé l'implication des cytokines IL-4, IL-10 et TGF- β et des cellules régulatrices dans la protection induite par l'OM-85, nous avons donc évalué l'implication de ces différents facteurs dans l'effet protecteur contre le DT1 de différents agonistes TLR.

Ainsi, des souris NOD de type sauvage ont reçu, de façon concomitante à l'administration de LPS, des injections d'anticorps bloquants anti-IL-10R ou anti-TGF- β . Aucun de ces deux traitements n'a réussi à lever la protection induite par le LPS. Nous ne pouvons toutefois pas exclure définitivement la possibilité d'un rôle effectif de ces deux cytokines, hypothèse qui devra être testée par l'utilisation de protocoles d'injections d'anticorps différents ou de souris NOD *Il-10*^{-/-}.

Le traitement de souris NOD *Cd1d*^{-/-} et NOD *Il4*^{-/-} nous a permis de déterminer que l'effet protecteur du LPS ne requiert pas la présence d'IL-4 ni celle de cellules CD1d restreintes.

En conclusion, nous montrons que des agonistes TLR préviennent les souris NOD de l'insulite et de l'apparition des signes cliniques du DT1. Bien que la démonstration de l'implication des cellules immunorégulatrices ne soit pas encore validée, la modulation des taux sériques des cytokines IL-10 et TGF- β , témoigne très certainement d'une activation durable des lymphocytes régulateurs par les agonistes TLR.

Publication : Immunoregulatory responses induced through TLRs and potential therapeutic implications for autoimmune diseases.

Aumeunier A, Grela F, Bardel E, Dy M, Akira S, Thieblemont N and Bach JF. Manuscrit soumis

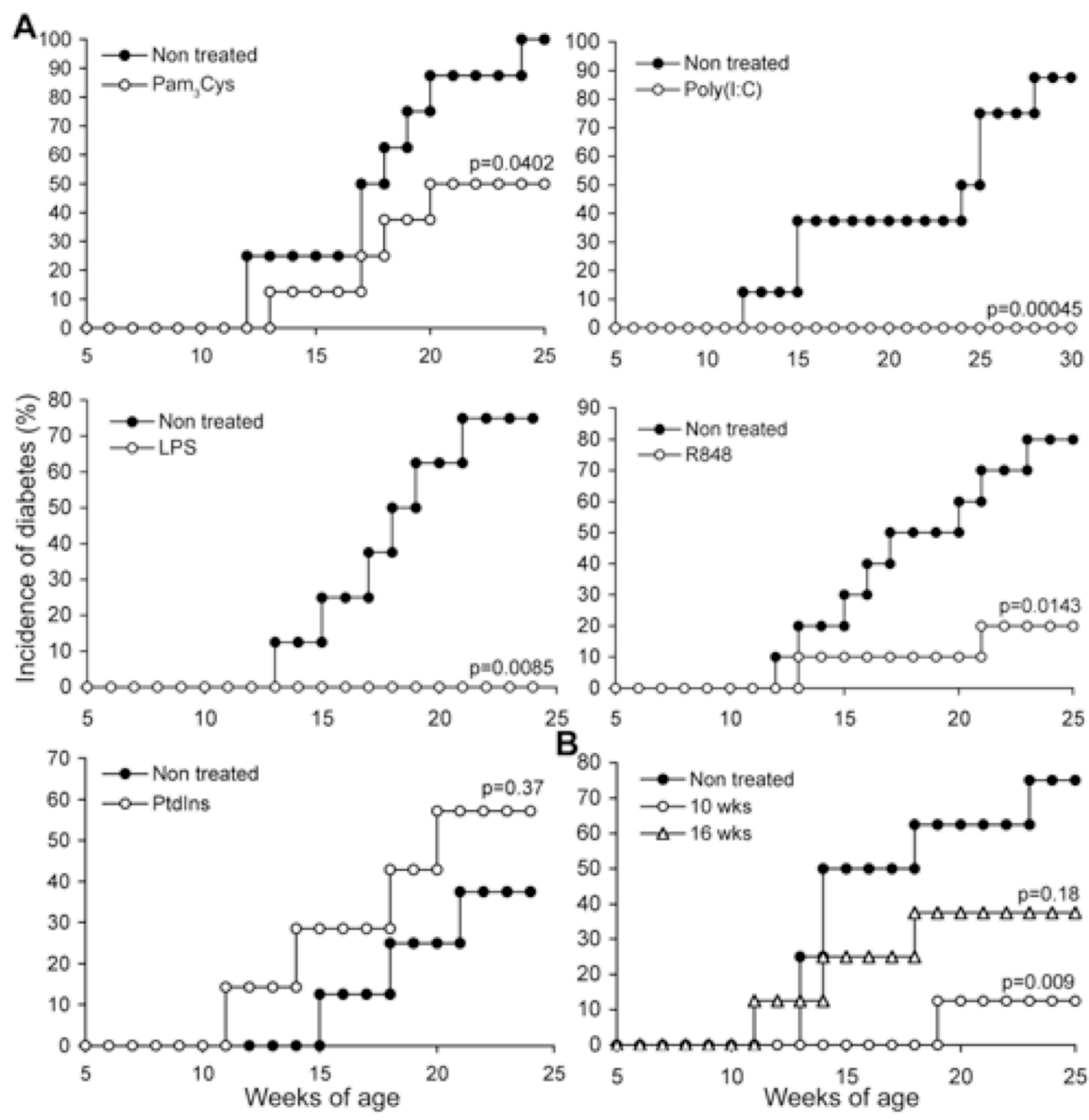


Figure 5. La stimulation des voies de signalisation TLR2, 3, 4 et 7 protège les souris NOD du diabète autoimmun. A. Les traitements sont administrés par voie orale (agoniste TLR2) ou intrapéritonéale (agonistes TLR3, TLR4 et TLR7). L'incidence du diabète est suivie par des tests de glycosuries. B. Cinétique de traitement par l'agoniste TLR3. La protection n'est observée que si le traitement commence précocement.

La stimulation par un agoniste TLR3, poly(I) :poly(C) est dépendante des cellules NKT et de l'IL-4

Dans le manuscrit précédent, nous avons démontré que des agonistes purifiés de différents TLR préviennent l'apparition du DT1 chez les souris NOD. Nous avons également précisé les mécanismes induits par l'activation du récepteur TLR2 susceptibles d'expliquer ce phénomène. Dans cette étude, nous avons tenté de déterminer si l'activation de la voie TLR3 induisait les mêmes mécanismes immunomodulateurs à l'origine de la protection contre le DT1. Nous nous sommes attachés à étudier le potentiel protecteur d'une molécule synthétique, le Poly(I) Poly(C), structurellement proche du Poly(I:C), agoniste du TLR3.

La première partie de notre étude a été consacrée à l'étude des voies de signalisation induites par le Poly(I) Poly(C). Nous avons donc stimulé des macrophages issus de souris C57BL/6 de type sauvage ou déficientes en TLR3 ou TRIF. Le Poly(I) Poly(C) induit la production de cytokines inflammatoires, dont le TNF- α , par les macrophages de type sauvage. Cette production est largement réduite, voire totalement abolie, en l'absence des protéines TLR3 ou TRIF.

Dans un second temps, nous avons administré de façon hebdomadaire le Poly(I) Poly(C) à des souris NOD. A l'instar du Poly(I:C), le Poly(I) Poly(C) protège les souris NOD de l'apparition du DT1 spontané. Le même protocole de traitement a été appliqué à des souris NOD déficientes en IL-4 ou en CD1d. Nous avons pu observer que ces animaux n'étaient pas protégés de la maladie par l'agoniste du TLR3. Les animaux *Cd1d*^{-/-} sont déficients en lymphocytes NKT. De plus, ces cellules ont été décrites pour produire rapidement et massivement de l'IL-4 après stimulation. La dépendance en IL-4 et en CD1d de l'effet protecteur du Poly(I) Poly(C) suggère donc fortement que cet agoniste du TLR3 exerce son activité protectrice au travers des lymphocytes NKT.

Ce travail, avec les manuscrits antérieurs, démontre l'effet protecteur des agonistes des TLR sur le développement du DT1. L'ensemble de ces travaux indique que la stimulation des voies TLR permet de moduler le recrutement et/ou l'activation de différentes populations régulatrices, par des mécanismes apparemment spécifiques de chaque récepteur. Il est intéressant de noter que les lymphocytes NKT semblent être activés *in vivo* par différents agonistes des TLR.

Il reste à déterminer si cette activation est directe ou nécessite un relais cellulaire, comme par exemple les DC.

Publication : The TLR3 agonist poly(I)poly(C) prevents autoimmune diabetes through activation of NKT cells and IL-4 production

Aumeunier A, Grell F, Bardel E, Ryffel B, Akira S, Dy M, Bach JF and Thieblemont N. Manuscrit en préparation.

La stimulation par un agoniste TLR2 protège du DT1

Pour des raisons de confidentialité, nous n'exposerons pas ces travaux, une demande de brevet étant en cours.

Publication : TLR2 prevents autoimmune diabetes through activation of NKT cells.

Aumeunier A, Grell F, N'Guyen T, Jeannin P, Bardel E, Dy M, Akira S, Thieblemont N and Bach JF. Brevet en préparation.

6. TLR et inflammation stérile : modèle de l'athérosclérose

Les dysfonctions du système immunitaire auxquelles peuvent être associés les TLR sont, comme nous l'avons vu précédemment, nombreuses. Elles comprennent notamment les maladies dites d'inflammation stérile caractérisées, comme leur nom l'indique, par une réponse immune inflammatoire dirigée contre l'hôte en l'absence de tout pathogène. Parmi elles, les maladies inflammatoires de l'intestin, dont la colite et la maladie de Crohn, ont été particulièrement étudiées. Afin de mieux appréhender les relations étroites existant entre les TLR, possiblement activables par des molécules endogènes, et ces désordres immunitaires, nous avons choisi le modèle de l'athérosclérose.

Définie par l'OMS comme "une association variable de remaniements de l'intima (paroi interne) des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média (tunique moyenne de l'artère)", l'athérosclérose est la première cause de mortalité au niveau mondial et à l'origine de la plupart des maladies cardio-vasculaires.

Les cytokines jouent un rôle crucial dans le processus athéromateux, et ce à tous les stades de son développement. Caractérisé par une inflammation chronique, il est logiquement entretenu par les cytokines pro-inflammatoires et à l'inverse inhibé par les anti-inflammatoires. Le rôle délétère des cytokines Th1 comprend notamment la stimulation de l'expression de chimiokines et molécules d'adhérence nécessaires au recrutement des cellules immunitaires et l'induction et/ou l'activation de diverses métalloprotéases participant à la fragilisation de la chape fibreuse. Au cours des dernières années, l'importance de ces cytokines dans le développement de la maladie a été confirmée dans divers modèles murins.

Le champ d'investigation le plus étudié concernant l'implication des TLR dans l'athérogénèse reste toutefois celui des agonistes endogènes. Les données expérimentales obtenues par différentes équipes et dans différents modèles suggèrent qu'en effet les TLR pourraient intervenir à de nombreux niveaux dans le processus athéromateux. Ainsi les LDL modifiées de façon minimale (mmLDL), précurseurs des oxLDL capables d'induire des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines pro-athérogènes, exercent nombre de leurs effets par l'intermédiaire des voies TLR. De plus, la reconnaissance du composant bioactif majeur des oxLDL, oxPAPC, par le TLR4 des cellules endothéliales a pour conséquence d'augmenter la sécrétion d'IL-8. Autres agonistes endogènes des TLR, les HSP et l'extra domaine A de la fibronectine sont impliquées dans la progression de l'athérosclérose, les premières en tant que cibles de réponses autoimmunes, la seconde comme molécule associée aux dommages et remodelage tissulaire en réponse à l'inflammation.

Un autre mécanisme par lequel les lipides générés de façon endogène peuvent interagir avec les TLR a été découvert récemment par l'analyse d'une mutation récessive induite au hasard par un agent mutagène. Les souris générées, présentant un défaut de production de TNF en réponse aux agonistes TLR2/TLR6, se sont révélées avoir une mutation dans le gène codant pour le récepteur scavenger CD36 participant à l'internalisation des oxLDL. Ce travail indique clairement que des ligands lipidiques endogènes peuvent faciliter la signalisation TLR par l'intermédiaire de co-récepteurs.

La souris déficiente pour TLR2 est protégée contre l'athérosclérose

Il est avéré depuis longtemps que les infections accélèrent le développement de l'athérosclérose. Plus récemment, plusieurs équipes ont démontré que la déficience en TLR ou en leur protéine adaptatrice commune, MyD88, protégeait les souris *ApoE*^{-/-} de la maladie (Bjorkbacka et al., 2004; Michelsen et al., 2004). Nous avons donc cherché à déterminer quel était le rôle des TLR, et plus particulièrement du TLR2 dans ces deux situations : le développement spontané de l'athérosclérose en conditions exemptes de pathogène et son accélération en conditions conventionnelles.

Dans ce but, nous avons généré les souris doublement mutées *ApoE*^{-/-} *Tlr2*^{-/-}. Ces animaux, de même que les contrôles *ApoE*^{-/-} *Tlr2*^{+/+}, ont été maintenus dans des conditions d'élevage exemptes de pathogène ou en animalerie conventionnelle aux standards sanitaires moins élevés. Une analyse quantitative et qualitative des lésions a été réalisée au niveau du sinus aortique chez des femelles âgées de 16 semaines. Par ailleurs, différents paramètres immunologiques ont été appréciés, reflétant le niveau d'inflammation global des animaux.

Une réduction significative de la surface et de la densité des lésions a été observée chez les souris *ApoE*^{-/-} *Tlr2*^{-/-} élevées en conditions EOPS par rapport aux souris contrôles. Ces résultats sont en accord avec la littérature et suggèrent l'existence d'un (ou de plusieurs) agoniste(s) endogène(s) du TLR2 à l'origine de l'athérosclérose dans ce modèle murin. Egalement, les taux sériques de TNF- α , IL-5, IL-6, IL-10, MCP-1, G-CSF, Gro-1/KC, MIP-2, éotaxine et P-sélectine sont significativement diminués chez les animaux doublement mutés, de même que le pourcentage de lymphocytes NKT, décrits comme pro-athérogènes. A l'inverse, la proportion de lymphocytes Treg circulant, cellules jouant un rôle protecteur contre le développement de la maladie, est fortement augmentée.

Dans les animaleries conventionnelles, où les conditions d'hygiène sont moins drastiques, les animaux se trouvent au contact de nombreux microorganismes de l'environnement. Dans ces conditions, les souris *ApoE*^{-/-} développent une pathologie accélérée et plus sévère que celle observée chez les animaux élevés en conditions EOPS. Cette accélération est encore amplifiée chez les souris déficientes en TLR2. L'étude comparative des animaux doublement mutés élevés en animalerie conventionnelle ou EOPS indique que l'exposition aux microorganismes induit l'augmentation des concentrations sériques de chimiokines, cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance et molécules d'adhésion. Les populations de cellules régulatrices sont

également fortement affectées : la proportion de lymphocytes NKT augmente significativement dans la rate alors que celle des lymphocytes Treg diminue dans le sang.

Nos travaux démontrent que dans des conditions d'élevage exemptes de pathogène, les animaux *Apoe*^{-/-} déficients en TLR2 présentent une pathologie moins sévère que leurs homologues *Tlr2*^{+/+}, suggérant l'existence d'un agoniste du TLR2 à l'origine de l'athérosclérose. Ainsi, la stimulation endogène du récepteur a des effets pro-athérogènes qui se traduisent par une modulation des paramètres tant histologiques qu'immunologiques. A l'inverse, l'accélération de la pathologie observée chez les animaux doublement mutés en animalerie conventionnelle suggère que la déficience en TLR2 augmente la susceptibilité aux infections, résultant en une charge inflammatoire globale plus élevée.

Nos résultats indiquent donc que le développement de l'athérosclérose est, dans le modèle murin *Apoe*^{-/-}, sous le double contrôle d'agonistes endogènes et exogènes des TLR. Cette conclusion témoigne de la limitation de l'étude des modèles murins pour rendre compte des pathologies du système immunitaire humaines et souligne le danger potentiel de l'utilisation d'antagonistes des voies TLR comme outils thérapeutiques.

Publication : Opposite atheromodulating effects triggered by endogenous and exogenous TLR agonists in apolipoprotein E knockout mice

*Aumeunier A, Bardel E, Ramadan A, Gaston AT, Dy M, Nicoletti A and Thieblemont N.
Manuscrit en préparation.*

7. Rôle de l'inflammation et de la voie de signalisation MyD88 dans le développement des cellules iNKT

Certains résultats que nous avons décrits ci-dessus indiquent qu'en situation pathologique l'activation des voies TLR, que ce soit par des molécules endogènes ou exogènes, a des effets majeurs sur la population lymphocytaire NKT. Nous avons donc émis l'hypothèse que la signalisation TLR pourrait intervenir dans le développement, le recrutement et/ou la fonction de ces cellules en conditions physiologiques normales.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons comparé le phénotype et la fonction des lymphocytes iNKT issus de souris C57BL/6 de type sauvage et déficientes en MyD88.

L'injection par voie intra péritonéale d' α -GalCer, ligand spécifique des cellules iNKT, induit chez les souris de type sauvage une très forte augmentation des concentrations sériques d'IL-4 et d'IFN- γ . Chez les souris *Myd88*^{-/-}, nous avons observé un défaut de production d'IL-4, mais pas d'IFN- γ . Cette cytokine pouvant être produite par les cellules NK, elles-mêmes activées par les cellules NKT, nous avons concentré notre étude sur la production d'IL-4, spécifique des lymphocytes iNKT. *In vitro*, les splénocytes et les cellules mononucléées du foie issus de souris déficientes en MyD88 présentent également une diminution significative de la production d'IL-4 en réponse à l' α -GalCer par rapport aux cellules de type sauvage. L'étude phénotypique réalisée *ex vivo* à l'aide de tétramères CD1d/ α -GalCer et d'anticorps anti-TCR α/β couplés à des fluorochromes a révélé l'existence d'un déficit numérique des cellules iNKT aussi bien dans le foie que dans la rate des animaux *Myd88*^{-/-}. De plus, les lymphocytes iNKT spléniques déficients en MyD88 présentent un défaut fonctionnel intrinsèque se traduisant par une diminution significative de la production tant d'IL-4 que d'IFN- γ par rapport aux cellules *Myd88*^{+/+}.

Nous avons alors émis l'hypothèse que les signaux activant les voies de signalisation TLR nécessaires au développement et/ou recrutement des lymphocytes iNKT ainsi qu'à leur fonction pourraient provenir de la microflore commensale. Il est effectivement connu depuis longtemps que les souris axéniques ont un système immunitaire immature. Nous avons donc comparé le phénotype et la fonction des lymphocytes iNKT issus de souris C57BL/6 élevées en conditions axéniques et EOPS.

Les souris axéniques, à l'instar des souris déficientes en MyD88, présentent un défaut de production d'IL-4 en réponse à l' α -GalCer tant *in vivo* qu'*in vitro*. Ce défaut de production d'IL-4 s'accompagne d'un déficit numérique de lymphocytes iNKT dans le foie et la rate. Cependant, à l'inverse des cellules *Myd88*^{-/-}, les cellules iNKT de la rate issues de souris axéniques ne présentent aucun défaut fonctionnel intrinsèque. Afin de vérifier le rôle de la flore sur le recrutement des cellules iNKT, nous avons reconstitué les souris axéniques maintenues en isolateur, par une flore de souris conventionnelle. Cependant, l'analyse des résultats a invalidé cette hypothèse puisque les souris reconstituées ne présentent pas un nombre de cellules iNKT supérieur aux souris axéniques.

Nous avons donc proposé une autre hypothèse qui postule que l'inflammation via la voie MyD88 pourrait être responsable du recrutement et de l'activation des cellules iNKT. En analysant les lymphocytes iNKT dans un contexte inflammatoire (modèle de l'athérosclérose), nous avons effectivement observé un impact majeur de l'inflammation sur le recrutement des cellules NKT. Enfin, les résultats *in vitro* valident cette proposition puisque l'IL-18, par exemple, qui signale via la molécule adaptatrice MyD88, facilite la réponse biologique des cellules iNKT.

En conclusion, nous proposons que l'environnement « pro-inflammatoire » est directement responsable du recrutement et de la réponse fonctionnelle des cellules iNKT.

Publication : The inflammatory MyD88 signaling pathway controls iNKT cell development and function

Aumeunier A, Ramadan A, Zhu R, Philadelphie E, Rabot S, Tsutsui H, Dy M, Herbelin A and Thieblemont N. Manuscrit en préparation.

8. Références

- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Bach, J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* 347, 911-920.
- Bach, J.F. and Chatenoud, L. (2001). Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 131-161.
- Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M.E., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., and Brutkiewicz, R.R. (1995). CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268, 863-865.
- Bjorkbacka, H., Kunjathoor, V.V., Moore, K.J., Koehn, S., Ordija, C.M., Lee, M.A., Means, T., Halmen, K., Luster, A.D., Golenbock, D.T., and Freeman, M.W. (2004). Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat. Med.* 10, 416-421.

Jeannin,P., Magistrelli,G., Goetsch,L., Haeuw,J.F., Thieblemont,N., Bonnefoy,J.Y., and Delneste,Y. (2002). Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine 20 Suppl 4*, A23-A27.

Kawai,T. and Akira,S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem. 141*, 137-145.

Mendiratta,S.K., Martin,W.D., Hong,S., Boesteanu,A., Joyce,S., and Van Kaer,L. (1997). CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity. 6*, 469-477.

Michelsen,K.S., Wong,M.H., Shah,P.K., Zhang,W., Yano,J., Doherty,T.M., Akira,S., Rajavashisth,T.B., and Arditi,M. (2004). Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101*, 10679-10684.

O'Neill,L.A. and Bowie,A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol. 7*, 353-364.

Sharif,S., Arreaza,G.A., Zucker,P., Mi,Q.S., Sondhi,J., Naidenko,O.V., Kronenberg,M., Koezuka,Y., Delovitch,T.L., Gombert,J.M., Leite-De-Moraes,M., Gouarin,C., Zhu,R., Hameg,A., Nakayama,T., Taniguchi,M., Lepault,F., Lehuen,A., Bach,J.F., and Herbelin,A. (2001). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat. Med. 7*, 1057-1062.

Strachan,D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ 299*, 1259-1260.

Umetsu,D.T., McIntire,J.J., Akbari,O., Macaubas,C., and Dekruyff,R.H. (2002). Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol. 3*, 715-720.

Van Kaer,L. (2004). Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells. *Immunol. Res. 30*, 139-153.

Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Hoshino,K., Kaisho,T., Sanjo,H., Takeuchi,O., Sugiyama,M., Okabe,M., Takeda,K., and Akira,S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science 301*, 640-643.